

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15537

研究課題名（和文）鱗翅目昆虫に特異的な二型精子の運命決定メカニズムの解明

研究課題名（英文）The analysis of dimorphic sperm formation in lepidopteran insect

研究代表者

酒井 弘貴（Sakai, Hiroki）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：30814660

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：鱗翅目昆虫であるカイコは、核を保持し卵との受精に用いられる「有核精子」に加え、核を持たない「無核精子」を形成する。本研究では、非常にユニークなカイコ精子の特徴を捉えるために、遺伝子発現や精核の形態学的特徴などに着目し調査を行った。

本研究の主要な成果として以下の三つがあげられる。1) 比較トランスクリプトームデータの解析によって、無核精子特異的に発現する遺伝子が複数得られた。2) 遺伝子組換えカイコ作出に必要な「集中産卵操作」における受精率の向上につながった。3) カイコ卵内における精子核の観察手法を確立し、受精前後における精子核の形態的な変化について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無核精子を利用した受精システムは、鱗翅目昆虫の繁栄をもたらした重要な生殖戦略の一つである。この仕組みを解明することは生物がもたらす多様な生殖戦略の理解につながる。また、カイコの生殖について理解することは、効率的な遺伝子組換えカイコ作出や、遺伝子組換えカイコの拡散防止技術につながる。

研究成果の概要（英文）：Lepidopteran insect forms “Eupyrene sperm” and “Apyrene sperm”. Eupyrene sperm have a nucleus and are used for fertilization with eggs. On the other hand, apyrene sperm do not have a nucleus. In this study, to investigate the characteristics of eupyrene and apyrene sperm in silkworm, we focused on the gene expression and morphological characteristics of these sperm. As a result of this study, analysis of comparative transcriptome data yielded multiple genes specifically expressed in apyrene sperm.

研究分野：蚕糸科学

キーワード：有核精子 無核精子 カイコ 雄性前核

## 1. 研究開始当初の背景

生物は子孫を残すために洗練された受精戦略を有する。鱗翅目昆虫では、核を保持し卵との受精に用いられる「有核精子」に加えて、核を持たない「無核精子」を精原細胞から分化させて受精を補助する。無核精子を利用した受精システムは、鱗翅目昆虫の繁栄をもたらした重要な生殖戦略の一つである。しかし、それを実現する遺伝的基盤は未解明のままであった。申請者らは、カイコの RNA 結合タンパク質遺伝子 *Sxl* 遺伝子の機能解析の過程で、偶然にもその変異体が無核精子の分化に異常が生じることを見出した (Sakai et al., 2019)。この *Sxl* 遺伝子に着目し分子生物学的な解析を行うことで、カイコ精子について、理解を深めることができると考えたのが、研究当初の背景である。

## 2. 研究の目的

本研究では、鱗翅目昆虫が形成するユニークな精子である「無核精子」について、鱗翅目昆虫であるカイコを用いて、理解を深めていくことを目的としている。無核精子は、核が無いため自身が受精できないにもかかわらず、「有核精子」の受精に必要な精子である。よって、カイコの無核精子を理解することは、カイコの受精率向上技術にもつながる。そこで、本研究では、遺伝子組換えカイコ等の作出に必要な技術である「集中産卵」操作時におけるカイコ受精率の改善もめざした。さらに、カイコ精子についての理解を深めるために、カイコ卵内へ侵入した精核が卵核と受精するまでの様子を観察した。

## 3. 研究の方法

- 1) 無核精子特異的に発現する遺伝子を探索するために、有核精子に分化する精母細胞 (有核型精母細胞) と無核精子に分化する精母細胞 (無核型精母細胞) の遺伝子発現に対して RNA-seq による比較トランスクリプトームデータ解析を行った。
- 2) 「集中産卵」操作時における受精率を改善するために、交尾後のカイコメス体内での精子の移動を詳細に観察した。カイコでは、交尾嚢に一度蓄えられたのちに、受精嚢へと移動して、初めて受精能力を獲得することから、受精嚢へ精子が移動するタイミングに着目した。
- 3) カイコ卵に侵入した精核が、雄性前核へと形態変化を経て雌性前核と接合する様子を、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

## 4. 研究成果

### 無核精子特異的に発現する遺伝子の探索

有核精子に分化するか、無核精子に分化するのかの運命決定がなされる時期は、形態学的な観察から精母細胞だと考えられている。そこで、有核精子と無核精子の減数分裂が生じる発育ステージが異なることに着目し、有核型精母細胞と無核型精母細胞の遺伝子発現に対して、RNA-seq による比較トランスクリプトームデータ解析を行った。その結果、無核精子特異的に発現する遺伝子が複数得られたので、それらの遺伝子の機能について、解析をおこなっている。

### 「集中産卵」操作時におけるカイコ受精率の改善

有核精子、無核精子の生理学的な特徴を捉えるために精子の挙動を観察した。この観察で得られた知見は、遺伝子組換えカイコ等の作出に必要な「集中産卵」操作時におけるカイコ受精率の向上技術につながることから、応用技術への可能性を検討した。

遺伝子組換えカイコ等の作出には、産卵直後のカイコ卵へ核酸試薬を顕微注入 (インジェクション) する必要がある。そのため、インジェクションを行うためにはカイコ卵を集中的に、産卵させる必要がある。カイコ蛾は、交尾後に数日冷蔵することで、集中的に産卵 (集中産卵) させることができる。この集中産卵時に、精子がメス体内での移動を完了していないと未受精卵となるので、冷蔵処理等を行ったメス体内での精子の移動のタイミングについて詳細に調べた。冷蔵中はカイコ精子の移動が妨げられたので、集中産卵操作を行う際は、交尾後、メス体内での交尾嚢から受精嚢への精子の移動が終わった後に、冷蔵する必要があることが分かった。メス体内での交尾嚢から受精嚢への精子の移動は、早い個体では一時間前後で行われるが、確実に受精嚢への精子の移動を完了させるために、交尾させたカイコ蛾を三時間程度室温で保管したのちに、冷蔵処理することが、望ましいことが分かった。

### 卵内へ侵入した精子の観察

カイコ精子をより深く理解するためには、受精前後の精核の挙動について、調べる必要があると考えた。そこで、卵内へ侵入した精核の挙動・形態変化を観察した。

まず、産卵直後の卵を観察したところ複数の精核が、卵内に侵入している様子が観察された。卵内に侵入した精核は約 1 時間かけて収縮し、収縮後さらに約 1 時間かけて、球体状の雄性前核

になることが分かった。受精直前・直後の雄性前核や雌性前核の形態的特徴は、これまでコオロギやショウジョウバエで報告されているものと酷似していたことから、精子が卵にたどり着くまでの仕組みは、昆虫種によって多様性があるのに対して、精子が卵内に侵入した後、雄性前核と雌性前核が接合するまでの挙動については、進化的に保存性が高いのではないかと考察した。

多くの動物において、卵内に侵入した精核は、核内タンパク質が雄由来のタンパク質から雌由来のタンパク質へと置換される際に、大きく形態を変化させる。本研究でカイコの精核の形態変化を観察したが、実際のタンパク質の置換を観察したわけではないので、その点に関して今後の研究が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroki Sakai, Tatsuro Konagaya, Yoko Takemura, Ken Sahara, Teruyuki Niimi	4. 巻 89(2)
2. 論文標題 Double-copulated introduction of ejaculate with dominant larval phenotype to maintain Bombyx mori mutant with dysfunctional apyrene sperm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11416/jibs.89.2_039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 酒井弘貴, 小長谷達郎, 新美輝幸	4. 巻 33
2. 論文標題 カイコにおける二重交尾とその応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昆虫DNA研究会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 41-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小長谷達郎, 酒井弘貴	4. 巻 56
2. 論文標題 鱗翅目昆虫における受精しない精子の謎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 18-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroki Sakai, Takeshi Yokoyama, Shuichiro Tomita	4. 巻 -
2. 論文標題 Observing silkworm embryos at the fertilization stage using a tissue clearing reagent	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinsphys.2022.104386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井弘貴
2. 発表標題 カイコの性と生殖に関する研究の魅力
3. 学会等名 日本蚕糸学会第 91 回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井弘貴, 横山岳, 富田秀一郎
2. 発表標題 透明化技術を用いたカイコ受精期における核の観察
3. 学会等名 日本蚕糸学会第 92回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------